

Über die Wirkung von Humanserum
auf die Adenosintriphosphorsäure
von Ehrlich-Ascitestumorzellen

Demetrius Kaniastas

1961

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. BÜNGELER

Über die Wirkung von
Humanserum auf die Adenosintriphosphorsäure
von Ehrlich-Ascitestumorzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt

von

Demetrius Kaniastas

aus

Griechenland

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Wirba -
Doz. Chr. Landschütz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Walter Büngeler

Dekan: Prof. Dr. Dr. Hermann Eyer

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 1961



E I N L E I T U N G U N D P R O B L E M S T E L L U N G

Vor einigen Jahren beschrieb Landschütz (19) folgenden Effekt:

Wurden Zellen des Ehrlich-Ascitestumors (EAT) mit frischem, menschlichem Blutserum bei 37°C in der Warburg-Apparatur bebrütet, so sank die Glycolyse der Zellen auf Null. Weiter beobachtete er, daß durch Zusatz von Adenosintriphosphorsäure (ATP) zu der Zellen-Serum-Mischung die Hemmung der Glycolyse wieder verschwand (20). Es fragte sich nun, ob die Hemmung der Glycolyse in irgend einem Zusammenhang mit der ATP stand. Wie wir wissen, benötigt die Zelle ATP, um Substrat zu verwerten. Wenn die Zelle den Zucker nicht mehr verarbeiten kann, hört auch die Glycolyse auf.

Es wurde der Gehalt der Zellen des EAT in Adenosintriphosphat unter der Wirkung von menschlichem Blutserum untersucht.

MATERIAL UND METHODE

a) Der Ehrlich-Ascites-Tumor (EAT)

In einer klassischen Arbeit haben Löwenthal und Jahn (25) die Entdeckung der Ascitesform des Ehrlich'schen Carcinoms publiziert. Löwenthal und Jahn haben zum ersten Mal gezeigt, daß das Ehrlich'sche Mäusecarcinom als hochkonzentrierte Suspension freier Tumorzellen in der Peritonealhöhle wachsen kann. Sie bezeichneten ihren Tumor als "Ascitestumor" und gaben eine Beschreibung seines Wachstums. Diese Entdeckung hat die Möglichkeiten der Arbeit mit transplantablen Tumoren beträchtlich erweitert, indem sie eine methodische Basis für quantitative und in vieler Hinsicht objektivere Untersuchung lieferten.

Nach der Definition von Klein (16) findet man bei Ascitestumoren eine acute Vermehrung freier neoplastischer Zellen oder Zell-Komplexe im Peritonealexsudat. Diese führt zu einer hohen absoluten und relativen Konzentration von Tumorzellen. Die Zellsuspension ist dann eine nahezu reine Kultur von Tumorzellen. Im Verlauf der Überführung eines soliden Tumors in die Ascitesform treten nach der Transplantation im neuen Wirt zunächst solide Tumoren und erst sekundär im Exsudat vermehrungsfähige freie Tumorzellen auf.

Transplantiert man die Zellen weiter, so kann man nach einer Anzahl von Transplantatgenerationen schließlich Tumoren erhalten, die schon primär unabhängig von soliden Tumoren sind.

Zwischen verschiedenen Ascitestumoren können Unterschiede im Wachstumsverhalten bestehen, selbst wenn sie zum gleichen morphogenetischen Typ gehören und im homologen Wirt wachsen. Der EAT wächst ausschließlich durch die Vermehrung frei im Peritonealexsudat suspendierter Zellen und zeigt keine Tendenz zur Bildung von Zellagregaten.

Daneben gibt es auch Ascitestumoren, bei denen die Zellen als Zellhaufen im Exsudat schwimmen, so z. B. das Ascites-Hepatom von Joshida (31). Da auch das Tumorstadium auf der Vermehrung der Zellen in Suspension beruht, klassifiziert man sie ebenfalls als Ascitestumoren.

Ascitestumoren ermöglichen erstmalig eine Tumorstadiumskurve mittels einer mehr direkten Technik zu erhalten, als durch die Bestimmung von Ge-

wicht oder Durchmesser solider Tumoren. Mit großer Genauigkeit kann man nach quantitativem Wachsen die Zellen auszählen, oder man kann in Verbindung mit der Zellzählung die Verdünnung injizierter Farbstoffe, wie z.B. Akriflavin oder die Verdünnung von P^{32} (Phosphor) nach der Injektion P^{32} markierter Zellen beobachten.

Die Möglichkeit einer Infiltration durch Tumorzellen stellt eine Fehlerquelle für die geschilderten Methoden dar. Bei typischen Ascitestumoren spielt die Infiltration jedoch, vor allen Dingen in den frühen Stadien der Tumorentwicklung, keine bedeutende Rolle.

Injiziert man Mäusen von Zellen des soliden Ehrlich'schen Carcinoms intraperitoneal, so erhält man neben einigen Fällen mit festen Geschwülsten auch solche Tiere, bei denen ein verteiltes Wachstum innerhalb der Bauchhöhle stattfindet, die gleichzeitig stark von Ascites erfüllt wird.

Die Bauchhöhlenflüssigkeit, die leicht durch Punktieren gewonnen werden kann und in der die Krebszellen enthalten sind, ergibt bei intramuskulärer oder subcutaner Injektion wieder feste Geschwülste. Bei intraperitonealer Injektion führt sie zu einer Vermehrung der Krebszellen innerhalb der Bauchhöhle unter Bildung großer Mengen Ascites. Bei der subcutanen Impfung von Gewebestückchen des Ehrlich'schen Mäusecarcinoms auf Mäuse beliebiger Herkunft findet man häufig Tiere, die den Tumor nicht annehmen, "sog. Nuller". Derartige "Nuller" zeigen nun keine Resistenz gegen den Ascitestumor.

Der Erfolg der Übertragung ist stets an das Vorhandensein von Krebszellen in dem Ascites gebunden.

Die zellfreie Bauchhöhlenflüssigkeit führt nicht zu der Ausbildung des Ascitestumors. Demgemäß ist auch die Wachstumsgeschwindigkeit des Ascitestumors von der Zahl der überimpften Krebszellen abhängig.

Es wurden 6 - 8 Tage alte EAT benutzt.

Der Tumorstamm wurde auf weißen Mäusen gehalten und durch intraperitoneales Verimpfen von 0,2 ml Tumorzell-Suspension aufrechterhalten.

b) Inkubation

Das Humanserum wurde von frischen Blutkonserven (Blutbank) ohne Zusätze gewonnen und bei -20° in Proben von 10 - 115 ccm gelagert. (Die größte

Zahl der Experimente wurde mit 2 aktiven Seren durchgeführt).

Die zytolysierende Eigenschaft des Serums wurde durch Erhitzen auf 56°C für 20 - 30 Min. im Wasserbad zerstört (inaktiviertes Serum). Es wurden weißen Mäusen intraperitoneal Aufschwemmungen von Zellen des EAT injiziert, man erhielt innerhalb von 8 Tagen durch Punktieren der geimpften Maus etwa 4 - 7 ccm Flüssigkeit, die reichlich Asciteszellen enthält. Die auf diese Weise gewonnenen Zellen wurden mit isotonischer Ringer-Lösung gemischt und zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde mit Ringer-Lösung auf 1, 2 ccm verdünnt und die Flüssigkeit gleichmäßig auf 3 verschiedene, vorgewärmte (37°) Zentrifugengläser verteilt. Nachdem in das erste dieser Zentrifugengläser 3, 8 ccm aktives nicht erhitztes Menschenserum, in das zweite 3, 8 ccm Menschenserum, das durch Erhitzen auf 56° inaktiviert wurde und in das dritte 3, 8 ccm Ringer-Bikarbonat-Lösung gefüllt wurde, wurden diese 3 Gläser im Wasserbad bei 37° , und zwar je nach Versuch 1, 2, 2, 5 oder 5 Minuten geschüttelt. Anschließend wurden die Gläser sofort in tiefgekühlte Zentrifugeneinsätze gegeben und 2 Min. bei etwa 2000 U/Min. zentrifugiert. Sofort nach dem Zentrifugieren wurde die gesamte überstehende Flüssigkeit aller drei Gläser abgegossen. Zu den Sedimenten wurde 0, 5 ccm 5%ige Trichloressigsäurelösung gegeben und einige Minuten lang mit einem Glasstab gerührt. Die derartig ausgefällten Eiweiße blieben im Eisschrank etwa 20 Stunden stehen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Röhrchen mit 3500 U/Min. in der Kälte zentrifugiert und die Überstände in vorher gut gereinigte Reaktionsgläser abgegossen.

c) Chromatographie

Von jeder Flüssigkeit wurden 0, 2 ccm entnommen und tropfenweise auf Chromatographiepapier aufgetragen, wobei jeder einzelne Tropfen erst eingetrocknete, bevor der nächste aufgetragen wurde. Die Tropfen wurden im kalten Strom eines Föhns getrocknet. Der Abstand des Föhns vom Papier betrug etwa 25 cm. Das Chromatographiepapier wurde anschließend in einem Gefäß derartig aufgehängt, daß der untere Rand des Papiers etwa einen halben cm tief in die Lösung eintaucht, die aus 20 ccm Isobutanol, 20 ccm Isopropanol, 40 ccm Aceton und 180 ccm 30%iger Ameisensäure bestand. Unter Berücksichtigung des R_f -Wertes der Nukleotide läßt man die Flüssigkeit etwa 17 - 19 Stunden auf dem Chromatographiepapier wandern. Die abgenommenen Papiere wurden mit Warmluft getrocknet und dann mit UV-Licht (Hanauer'sche Lampe) photographiert.

Sichtbarmachen der Nukleotides nach Markham und Smith (27):

Auf eine Holzplatte wurde ein Photopapier (Agfa-Copex) 21 x 29, 7 cm aufgelegt und darüber das getrocknete Chromatogramm befestigt. Als Lichtquelle diente eine Quecksilber-Dampflampe, Modell "Hanau". Photographiert wurde bei einer Wellenlänge von 260 m μ , dem Absorptionsbereich der Nukleotide. Die Belichtungszeit betrug 4 sec. Die mit der Flüssigkeit gewanderten Nukleotide erschienen nach dem Entwickeln auf dem Photopapier als länglich und rundlich geformte, weiße Flecken, die an den entsprechenden Stellen auf dem Chromatographiepapier geschnitten wurden.

<u>Lage der einzelnen Nukleotide:</u>	Adenosintriphosphorsäure	(ATP)
	Adenosindiphosphorsäure	(ADP)
	Adenosinmonophosphorsäure	(AMP)

Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Nukleotide ist verschieden, und zwar höher für die AMP, niedriger für die ADP und noch geringer für die ATP. Von der Startlinie aus betrachtet, wandern die Nukleotide in der Reihenfolge ATP - ADP - AMP.

d) Nachweis der Nukleotide

Die ausgeschnittenen Papierstückchen, welche die Nukleotide enthalten, kommen anschließend in gut gesäuberte Reaktionsgläser, in die 1 ccm 10/n HCL-Lösung pipettiert wurde, um die Nukleotide zu extrahieren. Nach etwa 12 - 14 Stunden Einwirkungszeit der HCL auf die ausgeschnittenen Papierstücke wurden sie vorsichtig ausgedrückt und entfernt.

Anschließend brachte man 0, 5 ccm HCL-Lösung, welche die extrahierten Nukleotide enthielt, in die Küvetten des Beckmann'schen Spektrophotometers. In die erste Küvette wurde als Kontrolle zur Einstellung des Apparates bidestilliertes Wasser pipettiert, in die nächsten 3 Küvetten die mit HCL-Lösung behandelten Nukleotide. Zu jeder einzelnen Messung wurde vorher der Apparat an der ersten Küvette geeicht (bidestilliertes Wasser) und auf Extinction kontrolliert.

Der R_f - Wert

Der R_f - Wert ist definiert als der Quotient aus der Entfernung der Substanz

vom Ausgangspunkt durch die Entfernung der Lösungsmittelfront vom Ausgangspunkt durch die Entfernung der Lösungsmittelfront vom Ausgangspunkt.

$$R_f = \frac{\text{Entfernung der Substanz vom Start}}{\text{Entfernung der Lösungsmittelfront vom Start}}$$

Die R_f - Werte können durch Temperatur, Konzentration, geringe Inhomogenitäten des Papiers, der Faserrichtung des Papiers, Fremdionen und Verunreinigungen des Lösungsmittels unter Umständen stark verändert werden. Sie sind außerdem etwas abhängig von der absoluten Länge des Papiers. Es ist daher praktischer und sicherer, auf einem breiten Papierstreifen bekannte Vergleichssubstanz neben der unbekannten Mischung laufen zu lassen. Man ist dann von solchen Störungen unabhängig und kann unmittelbar auf die Vergleichssubstanzen beziehen. Dies ist vor allem zweckmäßig, wenn man es mit einer aus vielen Komponenten bestehenden, möglicherweise noch durch Salze verunreinigten Lösung zu tun hat.

EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE :

Die R_f - Werte von ATP, ADP und AMP aus EAT-Zellen:

Die R_f - Werte wurden nach der oben angeführten Methode bestimmt.

In der nachstehenden Tabelle sind die Durchschnittswerte aus 12 Messungen angegeben:

Substanz:	ATP	ADP	AMP
R_f -Werte:	0,2	0,32	0,46

In einigen Versuchen lief im Chromatogramm eine Mischung von käuflicher ATP, ADP und AMP mit. Jede Substanz hatte eine Konzentration von $5 \cdot 10^{-3}$ molar. So war es möglich, mit diesen Vergleichssubstanzen und ihren bekannten R_f -Werten die im Chromatogramm aufzufindende Substanz zu identifizieren. Das Verhalten von ATP, ADP und AMP in EAT-Zellen in Gegenwart von aktivem Humanserum, inaktivem Humanserum und Ringer-Bikarbonat-Lösung.

a) Versuche mit Inkubation über 5 Minuten:

Die Zellen wurden in den vorgewärmten Medien 5 Minuten unter Schütteln mit der Hand bei 37° bebrütet. Wie die Untersuchung im Phasenkontrast-

mikroskop zeigte, waren nach dieser Zeit alle Zellen im aktiven Human-serum stark gequollen. Granula des Cytoplasmas hatten teilweise die Zellen verlassen, wobei ihre Brown'sche Molekularbewegung im Medium gut zu beobachten war. Die Zellmembran war stark aufgetrieben infolge Wassereintritts. Dagegen traten an den Zellen, die in 30 min. lang auf 56° erhitztes menschliches Serum und in Ringer-Bikarbonat-Lösung suspendiert waren, keine Lichtmikroskopisch zu beobachtenden Veränderungen auf. Jedoch war eine leichte Agglutination der Zellen im erhitzten Serum zu sehen.

Die Tabelle gibt das Verhalten der ATP, ADP und AMP der Zellen in den verschiedenen Medien wieder. Es sind Durchschnittswerte aus 5 Versuchen und zeigen die UV-Absorption bei 260 m μ .

A T P

Ringer	Aktives Serum	Inaktives Serum
0,05 - 0,09	Konzentr. zu gering	0,12 - 0,17

E 260 m μ

A D P

Ringer	Aktives Serum	Inaktives Serum
0,11 - 0,16	Konzentr. zu gering	0,04 - 0,08

E 260 m μ

A M P

Ringer	Aktives Serum	Inaktives Serum
0,15 - 0,19	Konzentr. zu gering	0,12 - 0,16

E 260 m μ

Wie das 5-Minuten-Experiment erkennen läßt, sind die Nukleotide unter den experimentellen Bedingungen in den EAT-Zellen in Gegenwart von aktivem Humanserum nicht mehr nachzuweisen. Das hitzeinaktivierte Serum und die Ringer-Lösung rufen keine signifikanten Veränderungen hervor. Die Meßwerte geben relative Konzentrationen der Nukleotide wieder. Die bei aktivem Serum erhaltenen Meßwerte lagen nicht mehr im Gültigkeitsbereich der Methode.

b) Versuche mit Inkubation über 2, 5 und 2 Minuten:

Bei den in dem 5-Minuten-Experiment ermittelten Ergebnissen war es nicht ausgeschlossen, daß das rapide Verschwinden der untersuchten Nukleotide aus der Zelle durch einen mehr passiven Austritt durch die aufgelockerte Zellmembran bedingt sein konnte und nicht durch ein intrazelluläres Verschwinden, sei es durch Abbau, sei es durch Hinderung der Neubildung dieser Substanzen. So hatte doch die phasenkontrastmikroskopische Beobachtung eine starke Zellquellung und Abgabe geformter Zellmaterials gezeigt. Wir wissen, daß ATP an die Zytoplasmastrukturen und an die flüssige Phase des Zytoplasmas gebunden ist. Aus dieser Überlegung heraus wurde das Verhalten der ATP, ADP und AMP der EAT-Zellen nach 2, 5 und 2 Minuten langem Einwirken der oben genannten Medien untersucht.

Vorversuche mit der Phasenkontrast-Optik gaben zu erkennen, daß auch diese Einwirkungszeiten noch zu lang waren. Etwa 30 % der Zellen waren so stark gequollen wie im 5-Minuten-Versuch, 20 % der Zellen zeigten eine deutliche abgehobene Zellmembran und 50 % der Zellen waren unverändert.

Die bei den einzelnen Medien ermittelten relativen Konzentrationen von ATP, ADP und AMP sind in folgender Tabelle enthalten und wurden aus 7 Versuchen ermittelt, von denen 5 Experimente bei einer Reaktionszeit von 2 Minuten und 2 bei 2, 5 Minuten Reaktionszeit durchgeführt wurden.

2, 5 und 2 Minuten

A T P

Ringer	Aktives Serum	Inaktives Serum
0, 09 - 0, 12	Konzentr. zu gering	0, 07 - 0, 1
E 260 m μ		

A D P

Ringer	Aktives Serum	Inaktives Serum
0, 09 - 0, 13	Konzentr. zu gering	0, 14 - 0, 18

E 260 m μ

A M P

Ringer	Aktives Serum	Inaktives Serum
0, 06 - 0, 09	Konzentr. zu gering	0, 17 - 0, 2

E 260 m μ

Auch dieses Resultat befriedigte nicht, da nicht eindeutig zu entscheiden war, ob der starke ATP-Schwund sich nicht auch hier auf die schnelle Quellung der Zelle mit einem damit verbundenen Substanzverlust durch einfache Diffusion in die Außenflüssigkeit zurückzuführen ließ.

c) Versuche mit Inkubation über 1 Minute:

Technisch war es nun gerade möglich, das ganze Experiment in einer Minute durchzuführen. Ein Testversuch zeigte, daß die Zellen, wenn sie nur eine Minute mit dem aktiven Human-Serum in Berührung waren, keine lichtmikroskopische sichtbaren Strukturveränderungen mehr aufwiesen.

Wie folgende Tabelle, deren Daten den Mittelwert aus 9 Experimenten angeben, nun zeigt, blieb der starke Schwund, von ATP, ADP und AMP auch nach der kurzen Inkubationszeit von 1 Minute mit Humanserum deutlich sichtbar:

1 Minute

A T P

Ringer	Aktives Serum	Inaktives Serum
0, 07 - 0, 1	Konzentr. zu gering	0, 08 - 0, 12

E 260 m μ

A D P

Ringer	Aktives Serum	Inaktives Serum
0,05 - 0,09	Konzentr. zu gering	0,7 - 0,81

E 260 m μ

A M P

Ringer	Aktives Serum	Inaktives Serum
0,14 - 0,16	Konzentr. zu gering	0,11 - 0,13

E 260 m μ

Für jeden Versuch wurde die Tumorzellsuspension einer Maus verwandt.

Die relativen Nukleotidkonzentrationen variieren zwischen einzelnen Ascites-tumoren, wie folgende Tabelle zeigt:

Experiment 3					
A T P		A D P		A M P	
Ringer	Inaktives Serum	Ringer	Inaktives Serum	Ringer	Inaktives Serum
0,13	0,1	0,07	0,15	0,09	0,08
Experiment 7					
0,08	0,19	0,17	0,08	0,14	0,16
Experiment 15					
0,19	0,07	0,13	0,16	0,11	0,1

E 260 m μ

Die Unterschiede dürften unter anderem durch das Alter des Ascitestumors, durch die Ernährung des Tumors und durch die Zusammensetzung der Ascites-flüssigkeit bedingt sein.

BESPRECHUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE

Diese Untersuchung wurde ausgelöst durch die Beobachtung von Landschütz (19), daß Humanserum die Glycolyse von EAT-Zellen hemmt. Damit ist ein Strukturverlust der Zellen verbunden, wie Löblich und Landschütz (24) später elektronenmikroskopisch zeigen konnten. Aus beiden Beobachtungen konnte die Frage nicht beantwortet werden, ob der Strukturverlust, die Cytolyse, die Folge der Glycolysehemmung ist, oder ob sich der Stop der Glycolyse auf die Cytolyse zurückführen läßt.

In ihrer elektronenmikroskopischen Analyse der Wirkung von EAT-Antiserum auf EAT-Zellen haben Löblich und Landschütz unter experimentellen Bedingungen gearbeitet, die es erlaubten, Hinweise auf die Wirkungen von heterologen Antikörpern bei der Cytolyse in der Frühphase zu erhalten. So konnten sie zeigen, daß nach einer Einwirkung von 2 Minuten das Antiserum folgende Veränderung an den EAT-Zellen hervorruft: An der Zelloberfläche entstehen Bläschen, die sich aus den Mikrowilli der Zellmembran bilden. Es entstehen kleine Cysten im Cytoplasma aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die Mitochondrien sind vergrößert. Die Autoren bezeichnen diese Umwandlung als erste Phase der Cytoplasmaumformung, welche sie auch bei ihren Arbeiten mit Humanserum beobachteten.

Die erste Phase ist eine Grenzflächenreaktion zwischen dem aktiven Antiserum und der Zelloberfläche. Da nun die Glycolyse bis 5 Minuten Beobachtungszeit erhalten bleibt und die Struktur der Zelle sich erst danach aufzulösen beginnt, äußern die Autoren, daß die Glycolysehemmung die Folge unbekannter biochemischer Veränderungen an der Zellmembran ist, die ihrerseits ein deutliches morphologisches Substrat haben. Man ist nach dieser Überlegung nun in der Lage, über die Reihenfolge Glycolysehemmung-Cytolyse zu sagen, daß der Glycolysehemmung biochemische Reaktionsabläufe vorausgehen, die sich zwischen der durch den Antikörper sensibilisierten Zellmembran und Faktoren des Komplements abspielen. Nach den Autoren ist der Wirkungsmechanismus für den morphologischen Reaktionsablauf an den EAT-Zellen sowohl für aktives Humanserum als auch für aktives Antiascitestumors serum derselbe. Welchen Beitrag können nun unsere experimentellen Ergebnisse zu den von Löblich und Landschütz erhobenen Befunden liefern? Es wurde gezeigt, daß der Gehalt der EAT-Zellen an ATP unter der Wirkung von aktivem Humanserum in der untersten technisch möglichen Beobachtungszeit von einer Minute sehr stark absinkt. Es ist bekannt, daß für den Transport von Glucose durch die Zellmembran ATP notwendig ist (13), daß weiter ATP sowohl für den Start als auch für den weiteren Abbau der Glucose gebraucht wird. Sinkt also der ATP-Spiegel der Zellen beträchtlich, so muß folglich

die Glycolyse aufhören, da kein Zucker mehr umgesetzt werden kann. Somit ließe sich die Ursache der Glycolysehemmung gut erklären mit dem Schwund der ATP.

Wie verhält es sich nun mit dem Strukturverlust der EAT-Zelle bei Gegenwart von aktivem Humanserum?

Die Glycolysehemmung kann dafür nicht verantwortlich sein, da Zellen auch ohne Glycolyse ihre Struktur bewahren.

Es bleibt also nun zu untersuchen, ob der ATP-Schwund die normale Morphologie einer Zelle ändern kann. Bei der Durchsicht der Literatur zum Problem Zellform und ATP wurden einige Hinweise gefunden, daß Zellform und ATP in Beziehung zu einander stehen, worüber kurz berichtet werden soll.

Im Jahre 1950 sprachen Goldacre und Lorch (8) die Vermutung aus, daß Bewegung und Sekretion bei Amöben mit der Wirkung kontraktile Proteine verbunden ist und daß ATP die Energie dafür abgibt. Über die Bedeutung eines solchen Mechanismus referierte Danielli (5) 1951. Lettré (22) hat dann auch derartige Überlegungen zur Erklärung von Cytoplasmabewegungen in der Gewebekultur und für die Zellteilung herangezogen.

Nach Lettré soll sich eine Zelle in einem durch ihre kontraktile Proteine bedingten Dauertonus befinden, der durch einen bestimmten ATP-Spiegel aufrechterhalten wird. Sinkt dieser, so soll es zu Zellbewegungen oder auch Zytoplasma-Abschnürungen kommen. Seelich und Stockingen (28) unterziehen die Folgerungen Lettré's einer Kritik, sie kommen aber zu dem Schluß, daß Oberflächenbewegungen von Zellen durch fermentative Vorgänge ausgelöst werden können. Die genannte Arbeit enthält interessante Bilder von Hühnerfibroblasten in Gegenwart von Antiserum und Komplement. Sie zeigen Zellreaktionen, wie sie auch von Löblich und Landschütz an EAT-Zellen bei der Immuncytolyse beschrieben wurden. In jüngster Zeit hatten Gropp und Hellweg (11) an in vitro gezüchteten Zellen enzymchemische Untersuchungen durchgeführt und alkalische Phosphatasen und Adenosintriphosphatase (12) an der Zelloberfläche nachgewiesen.

Sie diskutierten ihre Bedeutung für den Formwandel einer Zelle und referierten in diesem Zusammenhang die Arbeiten von Lettré (22) und Hoffmann-Berling und Weber (14). Letztere stellten ein kontraktiles Protein aus Sarkomzellen dar, das Adenosintriphosphataseaktivität hatte.

Betrachtet man die im experimentellen Teil der Arbeit erhobenen Befunde auf dem Hintergrund der Beziehungen zwischen Zellform und ATP, wie an

Hand obiger Literatur dargelegt wurde, so liegt die Vermutung sehr nahe, daß der durch aktives Humanserum an EAT-Zellen verursachte Schwund von ATP die Ursache des Zellzerfalls sein kann.

Landschütz (20) konnte früher zeigen, daß die Aktivität des im Humanserum anwesenden Zytotoxins komplementgebunden ist. Die von ihm mitgeteilten Befunde wurden von Landy und Mitarbeitern (18) bestätigt. Wird das Komplement durch Erhitzen des Humanserums auf 56° für 20 - 30 Minuten zerstört, agglutinieren die EAT-Zellen zwar noch, aber sie verhalten sich in ihre Glycolyse und im ATP-Gehalt normal. Das Zytotoxin im Humanserum ist nur wirksam gegen heterologe Zellen. Heterologe Zytotoxine von Seren beschrieb Lumsden schon 1929 (26). Sie verhalten sich wie künstliche, z. B. im Kaninchen erzeugte Antikörper und benötigen Komplement, unterscheiden sich aber von diesen dadurch, daß sie schon bei Erhitzen auf 56 - 58° für 60 Minuten zerstört werden. Die Vorgänge bei der Zytolyse von EAT-Zellen durch Humanserum können also im Prinzip denen bei der Immunzytolyse durch heterologe Antikörper parallel gestellt werden. Löblich und Landschütz wiesen darauf hin, daß bei der Zytolyse von EAT-Zellen durch Humanserum und durch heterologe Antikörper gleiche morphologische Formumwandlungen auftreten. Sie sind der Ansicht, daß bei den Zytolysen sich primäre biochemische Veränderungen an der Zellmembran abspielen.

Daß bei der Zytolyse von EAT-Zellen sowohl mit Humanserum als auch mit Kaninchen-Antitumorserum der rapide Abfall der ATP die primäre Ursache des Zellzerfalls sein kann, hat Landschütz (21) bei dem System EAT-Zellen, heterologe Antikörper und Komplement zeigen können. Er erhielt die gleichen Befunde, wie sie von mir in dieser Arbeit am Modell EAT-Zellen, Humanserum und Komplement beschrieben wurden, und er weist auf die Möglichkeit hin, daß allgemein die Ursache der Immunzytolyse ein plötzliches Verschwinden von ATP aus der Zelle ist.

Im Schrifttum sind Untersuchungen über biochemische Veränderungen bei der Immunzytolyse bekannt, Ellen (6) und Green und Mitarbeiter (10). Sie unterscheiden sich jedoch von den eigenen Experimenten im Folgenden: Es wurde nicht das Verhalten der ATP verfolgt. In diesen Arbeiten wurden die biochemischen Beobachtungen an Zellen erhoben, die schon längere Zeit (10 - 60 Min.) Antikörpern und Komplement ausgesetzt waren. Aus den Beobachtungen von Löblich und Landschütz (24) geht hervor, daß nach dieser Zeit viel Zellmaterial die Zelle durch eine aufgelockerte Membran verläßt, wie auch Goldberg und Green (9) bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von EAT-Zellen beobachteten. Willheim und Mitarbeiter (30),

Bolande (2, 3) und Fedoroff (7) haben auch über die cytolysierende Wirkung von Humanserum berichtet.

Z U S A M M E N F A S S U N G

In einer 35 Tiere umfassenden Versuchsreihe wurde bei mit 0,2 ccm Ascitestumor verimpften Mäusen nach 6 - 8 Tagen die Ascitesflüssigkeit durch Punktion gewonnen und mit isotonischer Ringer-Lösung gewaschen und verdünnt. Anschließend wurden die derart behandelten Ascitestumorzellen mit aktivem Serum, inaktivem Serum und Ringer-Bikarbonat-Lösung inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 1, 2, 2,5 und 5 Minuten. Nach Beendigung der Inkubation sofortiges Zentrifugieren in der Kälte und Ausfällen des Eiweißes mit 5%iger Trichlor-Essigsäurelösung. Nach etwa 12 - 18 Stunden wurden die ausgefallenen Eiweiße zentrifugiert und die Überstände tropfenweise auf Chromatographiepapier aufgetragen. Nach etwa 12 - 14 Stunden Wanderungszeit wurden die Chromatogramme in warmer Luft abgetrocknet und anschließend bei einer Wellenlänge von 260 m μ photographiert.

Die gewanderten Nukleotide erschienen als längliche oder rundliche Flecken auf dem Photopapier und wurden an den entsprechenden Stellen des Chromatographiepapiers ausgeschnitten. Die derartig ausgeschnittenen Papierstückchen kamen in gut gesäuberte Reagenzgläser, in die vorher 1 ccm 10/n HCL-Lösung pipetiert wurde. Auf diese Weise konnten die Nukleotide extrahiert und im Beckmann'schen Spektrophotometer bei 260 m μ gemessen werden.

Aus allen diesen Experimenten konnte geschlossen werden, daß EAT-Zellen in Gegenwart von komplement- und zytolysinhaltigem Humanserum schon nach 1 Minute Reaktionszeit so viel ATP verlieren, daß es unter den Bedingungen der Versuche nicht mehr nachzuweisen war.

Ein durch Erhitzen komplementfrei gemachtes Serum war ohne Einfluß auf den ATP-Gehalt der Zellen und zeigte keinen Unterschied zur Ringer-Kontrolle. Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die Ursache der Immunzytolyse in einem starken ATP-Abfall der Zelle zu suchen ist. Hierbei wird im Rahmen der vorhandenen Literatur auf die Bedeutung der ATP für die Zellform eingegangen.

Literaturverzeichnis

1. Ascites Tumors als Trols in quantitative Oncology: Ann, New York Academy sei. 19
2. Bolande, R. P. u. J. P. Maclain: Proc. Soc. exp. Biol. u. Med: 103, 345 (1960)
3. Bolande, R. P.: Lab. Inverst. 9, 475 (1960)
4. Brachet, J. Embryologie chimique, Paris 1947
5. Daniell, J. F. Nature 168, 464 (1951)
6. Ellem, K. A. D. Cancer Res. 18, 1179 (1958)
7. Fedoroff, S. J. exp. Med. 109, 615 (1959)
8. Goldacre u. Lorch: Nature 166, 497 (1950)
9. Goldberg, B. u. H. Green: exper. Med. 109, 505 (1959)
10. Green H., R. A. Fleisher u. B. Goldberg: J. exp. Med. 109, 511 (1959)
11. Gropp, A. u. H. R. Hellweg: Z. Zellforsch. 50, 315 (1959)
12. Gropp, A., K. Hupe u. H. R. Hellweg: Naturwiss. 45, 394 (1958)
13. Haas, Physiologie der Zelle. Borntraeger. Berlin 1955
14. Hoffmann-Berling H. u. H. H. Weber: Naturwiss. 42, 608 (1955)
15. Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Stuttgart 1960
16. Klein, G. u. E. Klein: Cancer Res. 11, 466 (1951)
18. Landy, M. J. Michael, R. J. Trapani, B. Achinstein, M. W. Woods u.
M. J. Shear: Cancerx Res. 20, 1279 (1960)
19. Landschütz, Chr.: Z. Naturforschung 11b 304 (1956)

20. Landschütz, Chr.: Unveröffentlichte Vers. Tübingen 1957
 21. Landschütz, Chr. Experimentia: 17, 15 (1961)
 22. Lettré, H. Naturwiss. 38, 490 (1951)
 24. Löblich, H. J. u. Chr. Landschütz: Z. Krebsforschung, 63, 335 (1960)
 25. Löwenthal, H. u. G. Jahn: Z. Krebsforsch. 37, 439 (1932)
 26. Lumsden, Th. u. A. C. Kohn-Speyer: J. path. a. Bact. 32, 185 (1929)
 27. Markham, R. u. J. D. Smith: Biochemie J. 45, 294 (1949)
 28. Seelich, F. u. L. Stockinger: Z. Zellforsch. 39, 212 (1953)
 30. Willheim, R., A. C. Jvg. u. H. M. Janecek: Exp. Med. u. Surg
15, 300 (1957)
 31. Joshida, T. Ann. New York Acad. Sei 1956.
-

Lebenslauf

Am 22. 4. 1934 wurde ich als Sohn des damaligen Notars E. Kaniastas in Kymi/Griechenland geboren. Nach Beendigung der Volksschulzeit besuchte ich das Gymnasium meiner Heimat und bestand das Abitur im Juni 1952. Anschließend blieb ich zu Hause bei meinen Eltern bis April 1953. Dann fuhr ich nach Saarbrücken und im Oktober desselben Jahres immatrikulierte ich an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes. Ich bestand das Vorphysikum im September 1954 und studierte weiter in Saarbrücken bis Juni 1955. Im Oktober 1955 immatrikulierte ich an der Medizinischen Fakultät der Universität München und bestand das Physikum im Juli 1956. Am 15. 12. 1959 bestand ich das ärztliche Staatsexamen. Vom 1. 2. 1960 bis 30. 6. 1960 arbeitete ich in der Ambulanz der chirurgischen Universitätsklinik München. Vom 19. 9. 1960 bis 30. 5. 1961 war ich an der chirurgischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Erding/Obb. tätig. Seit 1. 6. 1961 arbeite ich an der internen Abteilung des Kreis-Krankenhauses Haag/Obb.

